

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C07D 305/14		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/07882 (43) Date de publication internationale: 14 avril 1994 (14.04.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00972 (22) Date de dépôt international: 4 octobre 1993 (04.10.93)		(74) Mandataire: PILARD, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 92/11746 5 octobre 1992 (05.10.92) FR		(81) Etats désignés: AU, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, NO, NZ, PL, RU, SK, UA, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Déposant: RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(72) Inventeurs: GAULLIER, Jean-Claude ; 8, rue Jean-Baptiste-Clément, F-77420 Champs-sur-Marne (FR). MANDARD, Bernadette ; 32, rue des Ecoles, F-94140 Alfortville (FR). MARGRAFF, Rodolphe ; 16, allée du Potager, F-91170 Viry-Châtillon (FR).			

(54) Title: METHOD OF OBTAINING 10-DEACETYLBACCATINE III

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE LA DESACETYL-10 BACCATINE III

(57) Abstract

Method of obtaining 10-deacetylbaccatine III from different parts of the yew tree (Taxus sp.) by extraction and selective crystallization from a methanol extract of the plant mass.

(57) Abrégé

Procédé d'obtention de la désacetyl-10 baccatine III à partir des différentes parties de l'if (Taxus sp) par extraction et cristallisation sélective à partir d'un extrait méthanolique de la masse végétale.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.**

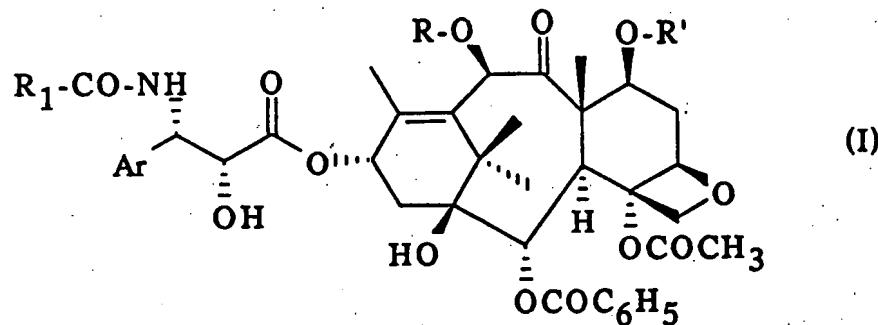
AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CC	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE D'OBTENTION DE LA DESACETYL-10 BACCATINE III

La présente invention concerne un procédé pour obtenir sélectivement des intermédiaires utiles pour la préparation par des procédés semi-synthétiques du taxol, du Taxotère ou de leurs analogues à partir des différentes parties de plantes contenant 5 ces intermédiaires.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'obtention de la désacétyl-10 baccatine III à partir de l'écorce, du tronc, des racines ou des feuilles de différentes espèces d'ifs.

Le taxol et le Taxotère ainsi que leurs analogues de formule générale :



10

qui manifestent des propriétés anticancéreuses et antileucémiques remarquables, constituent des agents chimiothérapeutiques remarquables pour le traitement d'un certain nombre de cancers tels que par exemple les cancers du sein, de la prostate, du colon, de l'estomac, du rein ou des testicules et plus spécialement le cancer de 15 l'ovaire.

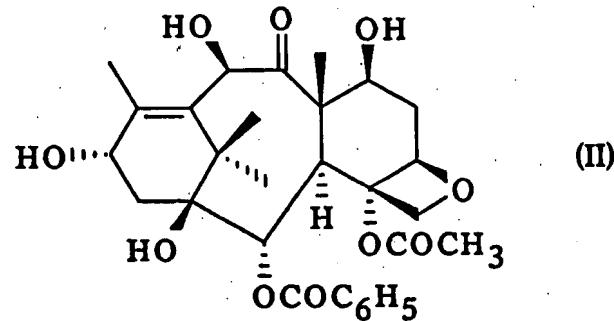
Notamment, dans la formule générale (I), Ar peut représenter un radical phényle éventuellement substitué, R peut représenter un atome d'hydrogène ou un radical acétyle ou un radical carbamoyle N-substitué, R' représente un atome d'hydrogène ou un radical carbamoyle N-substitué et R₁ peut représenter un radical phényle ou un radical R₂-O- dans lequel R₂ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle, bicycloalcoyle, phényle ou hétérocyclyle.

Le taxol correspond au produit de formule générale (I) dans laquelle Ar et R₁ représentent un radical phényle et R représente un radical acétyle et R' représente un atome d'hydrogène et le Taxotère correspond au produit de formule générale (I) 20 dans laquelle Ar représente un radical phényle, R et R' représentent un atome d'hydrogène et R₁ représente un radical t.butoxy.

Le taxol, qui existe à l'état naturel dans différentes espèces d'ifs dans lesquelles il se trouve en faibles quantités, est difficile à isoler sans procéder à la

destruction complète de la plante. Par exemple, le taxol peut être isolé selon la méthode de C.H.O. HUANG et coll. J. Natl. Prod., 49, 665 (1986) qui consiste à traiter l'écorce broyée de *Taxus brevifolia* par le méthanol, à concentrer l'extrait, extraire le concentrat par le dichlorométhane, à concentrer à nouveau, à disperser le résidu dans un mélange hexane-acétone (1-1 en volumes), à purifier la partie soluble par chromatographie sur une colonne de Florisil pour obtenir le taxol brut qui est purifié par recristallisations successives dans des mélanges méthanol-eau et hexane-acétone puis par chromatographie et nouvelle cristallisation. Les quantités de taxol ainsi extraites peuvent représenter de 0,005 à 0,017 % de la partie de la plante mise en oeuvre.

Le Taxotère qui n'existe pas à l'état naturel peut être préparé par hémisynthèse à partir de la désacétyl-10 baccatine III de formule :



selon les procédés qui sont décrits, par exemple, dans les brevets américains 15 US 4,814,470 ou US 4,924,012 ou dans la demande internationale PCT WO 92/09589.

Le taxol peut aussi être préparé par des procédés qui font intervenir la mise en oeuvre de la désacétyl-10 baccatine III soit par passage par l'intermédiaire du Taxotère dans les conditions décrites dans le brevet américain US 4,857,653 soit par 20 estérfication de la baccatine III dans les conditions décrites dans les brevets européens EP 400,971 ou EP 428,376 soit par estérfication de la désacétyl-10 baccatine III et acétylation dans les conditions décrites dans le brevet américain US 4,924,011.

Les différentes variétés d'ifs (*Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus canadensis*, *Taxus cupidata*, *Taxus floridana*, *Taxus media* et *Taxus wallichiana*) 25 contiennent des dérivés du taxane dont les principaux sont essentiellement le taxol et la désacétyl-10 baccatine III, les autres dérivés étant plus particulièrement la

céphalomannine, la désacétyl-10 céphalomannine ou la baccatine III éventuellement liés à des sucres.

Alors que le taxol se trouve principalement dans le tronc et l'écorce, la désacétyl-10 baccatine III est présente essentiellement dans les feuilles. Par ailleurs, la teneur en désacétyl-10 baccatine III dans les feuilles est généralement très supérieure à celle du taxol, que celui-ci soit présent dans l'écorce, le tronc ou dans les feuilles.

Il en résulte qu'il est particulièrement important de pouvoir disposer de désacétyl-10 baccatine III qui est essentielle à la préparation de quantités de taxol beaucoup plus importantes que par extraction directe à partir des ifs ainsi qu'à la préparation du Taxotère.

En extrayant la désacétyl-10 baccatine III à partir des feuilles d'ifs, on n'est pas conduit à une destruction totale de la plante dont les feuilles peuvent être utilisées à nouveau après chaque cycle de croissance.

Généralement, les méthodes connues d'extraction des dérivés du taxane contenus dans les différentes parties de l'if (écorce, tronc, racines, feuilles,) nécessitent la mise en oeuvre de techniques chromatographiques longues et coûteuses qui ne permettent pas une séparation totale et quantitative des dérivés du taxane présents initialement dans la plante.

Selon le procédé décrit dans le brevet américain US 4,814,470 qui met en oeuvre une macération des aiguilles dans l'éthanol, une extraction par un solvant organique tel que le chlorure de méthylène et des chromatographies successives, il est possible d'isoler environ 40 % de la désacétyl-10 baccatine III contenue dans les feuilles.

Les différents constituants dérivés du taxane présents dans les différentes parties de l'if peuvent aussi être séparés par des méthodes mettant en oeuvre la chromatographie en phase liquide "reverse" qui sont décrites, en particulier dans la demande international PCT WO 92/07842. Ces procédés consistent essentiellement à traiter les extraits bruts d'ifs par chromatographie en phase liquide "reverse" sur un adsorbant sur lequel se fixent les dérivés du taxane, à éluer les dérivés du taxane et à les isoler. Selon ce procédé, il est possible d'isoler environ 25 % de la désacétyl-10 baccatine III contenue dans les feuilles.

Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que la désacétyl-10 baccatine III peut être extraite sélectivement à partir des différentes parties de l'if, et plus particulièrement des feuilles, par un procédé simple

ne mettant pas en oeuvre des techniques chromatographiques. Par exemple, il est possible d'extraire environ 75 % de la désacétyl-10 baccatine III présente dans les feuilles.

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention consiste :

5 - ou bien

- 1) à traiter les parties broyées de l'if (Taxus sp.) par un alcool aliphatique de façon à obtenir un extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III,
- 2) à diluer à l'eau l'extrait alcoolique éventuellement concentré,
- 3) à séparer par filtration, décantation ou centrifugation les insolubles présents dans la 10 solution hydro-alcoolique obtenue,
- 4) à éliminer la quasi totalité de l'alcool de la solution hydro-alcoolique,
- 5) à extraire la désacétyl-10 baccatine III de la phase aqueuse ainsi obtenue par un solvant organique convenable,
- 6) à éliminer le solvant de l'extrait organique ainsi obtenu contenant la désacétyl-10 15 baccatine III,
- 7) à faire cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III, à partir du résidu ainsi obtenu, dans un solvant organique,
- 8) à isoler la désacétyl-10 baccatine III purifiée.

- ou bien

- 20 1) à traiter les parties broyées de l'if (Taxus sp.) par un alcool aliphatique de façon à obtenir un extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III,
- 2) à extraire l'extrait alcoolique par un solvant organique,
- 3) à séparer la phase hydro-alcoolique obtenue par décantation,
- 4) à diluer par l'eau la phase hydro-alcoolique,
- 25 5) à séparer par filtration, décantation ou centrifugation les insolubles présents dans la solution hydro-alcoolique obtenue,

- 6) à extraire la désacétyl-10 baccatine III de la phase hydro-alcoolique filtrée par un solvant organique,
- 7) à éliminer totalement ou partiellement le solvant de l'extrait organique contenant la désacétyl-10 baccatine III,
- 5 8) à faire cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III, à partir de la solution ou du résidu obtenu, dans un solvant organique,
- 9) à isoler la désacétyl-10 baccatine III purifiée

Le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre sur toute partie appropriée de l'if telle que l'écorce, le tronc, les racines ou les feuilles. L'if utilisé pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention appartient de préférence à la variété *Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus canadensis*, *Taxus cupidata*, *Taxus floridana*, *Taxus media* ou *Taxus wallichiana*. Il est particulièrement avantageux d'utiliser les feuilles d'if (*Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*) qui généralement sont plus riches en désacétyl-10 baccatine III. Pour une meilleure mise en oeuvre du procédé, il est préférable d'utiliser les différentes parties de l'if sous forme broyée et éventuellement séchée. Les fragments utilisés peuvent avoir des dimensions variant de 0,5 à quelques millimètres. Pour des questions de commodité, il peut être avantageux d'utiliser des fragments dont les dimensions moyennes sont inférieures à 1 mm. Les parties broyées et éventuellement séchées de l'if peuvent être obtenues par des opérations de broyage et éventuellement de séchage qui, éventuellement, précédent ou suivent des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante ou s'intercalent dans des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante.

L'extrait alcoolique est obtenu en agitant un mélange, éventuellement chauffé, des parties broyées et éventuellement séchées de l'if avec un alcool généralement choisi parmi le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol et le t.butanol. Il est particulièrement avantageux d'utiliser le méthanol.

L'extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III peut être traité selon l'une des méthodes suivantes :

- 30 1) l'extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III est dilué par addition d'eau pour donner une solution hydro-alcoolique.

Pour la mise en oeuvre du procédé, il est avantageux de se placer dans des conditions particulières de dilution et de teneur en alcool dans la phase aqueuse, de façon à éviter les pertes en désacétyl-10 baccatine III et à éliminer la plus grande quantité possible de produits insolubles. Dans ces conditions, il peut être nécessaire 5 de concentrer l'extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III préalablement à la dilution par l'eau.

Plus particulièrement, la dilution par addition d'eau dans l'extrait alcoolique éventuellement concentré par distillation, de préférence sous pression réduite, doit 10 être faite de telle manière que le rapport entre le poids du mélange diluant et le poids de la matière sèche contenue dans l'extrait alcoolique soit compris entre 4 et 8, le mélange diluant eau-alcool contenant 10 à 30 % en poids d'alcool.

Les produits insolubles dans la solution hydro-alcoolique ainsi obtenue sont 15 éliminés selon les techniques habituelles et de préférence par filtration, par décantation ou par centrifugation. Lorsque l'élimination est effectuée par filtration, il peut être avantageux d'opérer en présence d'un agent de filtration tel que la terre d'infusoire (célite) et d'un agent floculant.

De préférence, l'élimination de l'alcool de la solution hydro-alcoolique ainsi obtenue est effectuée par distillation, de préférence sous pression réduite, éventuellement en présence d'un agent antimousse, de façon à éviter ou à limiter la 20 dégradation thermique des constituants du milieu.

Généralement, la désacétyl-10 baccatine III contenue dans solution aqueuse ainsi obtenue, dans laquelle la teneur en alcool est généralement inférieure à 1 %, est extraite, en une ou plusieurs fois, par un solvant organique choisi parmi les éthers tels que le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, le méthyl n.butyléther, le méthyl 25 n.amyléther, l'éthyl t.amyléther, le t.butyl isopropyléther, l'éthyl isobutyléther, le t.butyl n.propyléther ou l'éthyl n.hexyléther et les esters aliphatiques tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate de propyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle, l'acétate de t.butyle, le t.butylacétate de méthyle, le propionate de t.butyle ou l'acétate de t.amyle. D'un intérêt tout particulier sont le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, l'acétate 30 d'éthyle ou l'acétate de n.butyle. Plus spécialement encore, il est avantageux d'utiliser l'acétate d'éthyle ou l'acétate de n.butyle,

2) l'extrait alcoolique, qui contient de l'eau provenant des feuilles d'if mises en oeuvre, est extrait par un solvant organique approprié choisi parmi les hydrocarbures aromatiques tels que le toluène ou le xylène.

L'extrait hydro-alcoolique est dilué par addition d'eau, de façon que l'extrait contienne de 20 à 40 % d'alcool, puis il est filtré ou décanté ou centrifugé pour séparer les insolubles présents. La solution hydro-alcoolique obtenue qui contient la désacétyl-10 baccatine III est extraite en une ou plusieurs fois, par un solvant organique choisi parmi les éthers tels que le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, le méthyl n.butyléther, le méthyl n.amyléther, l'éthyl t.amyléther, le t.butyl isopropyléther, l'éthyl isobutyléther, le t.butyl n.propyléther ou l'éthyl n.hexyléther et les esters aliphatiques tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate de propyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle, l'acétate de t.butyle, le t.butylacétate de méthyle, le propionate de t.butyle ou l'acétate de t.amyle. D'un intérêt tout particulier sont le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, l'acétate d'éthyle ou l'acétate de n.butyle. Plus spécialement encore, il est avantageux d'utiliser l'acétate d'éthyle ou l'acétate de n.butyle,

Les extraits organiques, obtenus selon l'une ou l'autre voie, sont éventuellement lavés au moyen d'une solution aqueuse d'une base faible (solution aqueuse de carbonate de sodium par exemple) et/ou à l'eau. Après séchage éventuel, le solvant organique de l'extrait est éliminé, totalement ou partiellement, selon les méthodes habituelles et en particulier par distillation éventuellement sous pression réduite, pour donner une solution ou résidu généralement solide dont on isole la désacétyl-10 baccatine III.

La cristallisation sélective de la désacétyl-10 baccatine III est effectuée à partir d'une solution dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques. Comme solvants permettant la cristallisation sélective de la désacétyl-10 baccatine III peuvent être avantageusement utilisés les nitriles tels que l'acétonitrile ou le propionitrile, éventuellement en mélange avec un alcool aliphatique tel que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol ou le n.butanol ou un ester aliphatique tel que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle ou l'acétate de t.butyle ou une cétone telle que l'acétone, la méthyl éthylcétone, la méthyl propylcétone, la méthyl n.buylcétone et la méthyl isobutylcétone. Il est particulièrement avantageux d'effectuer la cristallisation sélective dans l'acétonitrile éventuellement en présence d'éthanol et/ou d'acétone et/ou d'acétate d'éthyle et/ou d'acétate de n.butyle.

La désacétyl-10 baccatine III qui précipite peut être isolée par filtration, décantation ou centrifugation.

La désacétyl-10 baccatine III obtenue selon la procédé d'extraction de la présente invention peut être utilisée pour préparer le taxol ou le Taxotère ou leurs dérivés dans les conditions décrites plus particulièrement dans les brevets EP 0 253 738, EP 0 253 739, EP 0 336 840, EP 0 336 841, WO 92 09589, 5 EP 0 400 971 et EP 0 428 376.

Les exemples suivants illustrent le procédé selon l'invention.

EXEMPLE 1

Dans un percolateur, on place 200 litres de méthanol, 1,4 kg de laine de verre et 250 kg de feuilles d'if (*Taxus baccata*) broyées dont la taille moyenne des particules est voisine de 0,8 mm. On ajoute 400 litres de méthanol pur. La percolation est effectuée en alimentant le percolateur en solvant frais par le haut, au débit de 870 litres/heure, et en recueillant l'extrait méthanolique au bas du percolateur. La percolation dure 5 heures à 20°C. La solution méthanolique recueillie est évaporée sous pression réduite (70-80 kPa) à 40°C dans un évaporateur pour obtenir un concentrat dont la teneur en matière sèche est comprise entre 40 et 80 % en poids. 10 15

On utilise un extrait méthanolique (préparé dans les conditions décrites ci-dessus) contenant 353 g d'extrait sec, 420 g de méthanol et 40 g d'eau, la quantité de désacétyl-10 baccatine III présente étant de 1130 mg.

Dans un réacteur de 2 litres, on introduit l'extrait méthanolique puis, en agitant, 1590 cm³ d'eau. Le mélange est agité pendant 1 heure puis on ajoute successivement 35 g de célite en agitant pendant 1 heure et 25 cm³ de flocculant "ZETAG 87". La suspension finale obtenue est filtrée sur verre fritté N°4 de 130 mm de diamètre. Les produits insolubles et la célite sont lavés par 100 g d'un mélange eau-méthanol (8-2 en poids). 20 25

Le filtrat est placé dans un réacteur de 2 litres puis on ajoute 2 cm³ de SILICONE 426R. Le mélange est distillé sous pression réduite (7,3-11 kPa) à une température comprise entre 35 et 42°C, la température du bain extérieur étant comprise entre 45 et 50°C. On obtient un distillat (909 g) et un concentrat (1432 g) contenant 0,5 % de méthanol.

Le concentrat est extrait 1 fois par 700 cm³ d'acétate d'éthyle puis 2 fois par 350 cm³ d'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois par 700 cm³ d'une solution 0,1 M de carbonate de sodium puis par 1 fois 350 cm³ d'eau. 30

Le pH est égal à 8. La phase organique (1049 g) est concentrée à sec sous pression réduite (1,33-21,3 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 16,2 g d'extrait sec.

EXEMPLE 2

Dans un ballon de 500 cm³, on introduit 45,5 g d'extrait sec contenant 9,3 % de désacétyl-10 baccatine III obtenu dans les conditions décrites dans l'exemple 1 puis on ajoute 18 cm³ d'acétate d'éthyle. Le mélange homogène est agité et chauffé à 50°C. On ajoute alors 136 cm³ d'acétonitrile en 15 minutes à 50°C. La suspension est agitée pendant environ 1 heure puis elle est refroidie à une température voisine de 20°C en environ 3 heures. Le précipité est séparé par filtration sur verre fritté N°3 (diamètre : 35 mm) puis il est lavé par 20 cm³ d'acétonitrile puis par 2 fois 20 cm³ de diisopropyléther. Le produit est séché sous pression réduite (1,33 kPa) à 40°C pendant 20 heures. On obtient ainsi 5,2 g d'un produit blanc contenant 75,8 % de désacétyl-10 baccatine III.

Le rendement de la cristallisation est de 93,6 %.

15 EXEMPLE 3

Dans un ballon de 1 litre, on introduit 275,2 g d'une solution dans l'acétate d'éthyle de 39,6 g de matière sèche contenant 3,48 g de désacétyl-10 baccatine III. Cette solution est concentrée sous pression réduite (6,0 kPa). On recueille 164 g d'acétate d'éthyle. Au concentrat, on ajoute 36 cm³ d'éthanol puis on refroidit à 10°C. 20 On ajoute alors lentement (1/2 heure environ) en agitant (30 tours/minute) 60 cm³ d'acétonitrile. La suspension est agitée pendant 1 heure à 10°C puis on ajoute rapidement 84 cm³ d'acétonitrile. On agite pendant 15 heures à 10°C. Le précipité est séparé par filtration sur verre fritté N° 3 (diamètre : 35 mm) puis il est lavé par 2 fois 20 cm³ d'acétonitrile puis par 2 fois 20 cm³ de diisopropyléther. Le produit est séché pendant 12 heures sous pression réduite (0,27 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 2,85 g d'une poudre blanche cristallisée contenant 93,8 % de désacétyl-10 baccatine III.

Les eaux-mères de cristallisation et les lavages (247 g) sont concentrés sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 36 g de substance sèche qui est reprise par 18 cm³ d'éthanol. On ajoute alors lentement 72 cm³ d'acétonitrile. Le mélange est agité pendant 15 heures à un température voisine de 20°C. Le précipité est séparé par filtration et est lavé par 2 fois 5 cm³ d'acétonitrile et par 2 fois 5 cm³ de diisopropyléther. Après séchage, on obtient 0,662 g d'une poudre fine contenant 62,7 % de désacétyl-10 baccatine III.

EXEMPLE 4

On utilise un extrait méthanolique préparé dans les conditions décrites dans l'exemple 1 constitué de 1840 g d'extrait sec, de 1117 g de méthanol et de 329 g d'eau et contenant 7,17 g de désacétyl-10 baccatine III.

5 Dans un réacteur de 10 litres, on introduit l'extrait méthanolique puis on l'extrait 3 fois par 1,5 litre de toluène sous forte agitation. La phase hydro-méthanolique est séparée (3020 g) par décantation, diluée par addition d'eau (3800 g) puis filtrée. On sépare ainsi 42 g de résidu.

10 La solution hydro-méthanolique filtrée est extraite 3 fois par 1540 cm³ d'acétate de n.butyle. Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite (1,33 kPa) à 40°C de façon à obtenir une solution contenant 30 % d'extrait sec puis filtrées. Le résidu obtenu (4 g) est lavé par 50 cm³ d'acétate de n.butyle. Les filtrats organiques sont réunis et concentrés à nouveau sous pression réduite (1,33 kPa) à 40°C de façon à obtenir une solution contenant 65 % d'extrait sec (soit 95 g).

15 Le concentrat ainsi obtenu est introduit dans un ballon de 500 cm³. On ajoute 45 cm³ d'éthanol. Le mélange homogène est agité et chauffé à 40°C. On ajoute alors en 1 heure, à 40°C, 270 cm³ d'acetonitrile. La suspension est refroidie à -10°C, tout en agitant, en 2 heures puis maintenue à -10°C pendant une nuit. Le précipité est séparé par filtration sur verre fritté, lavé 2 fois par 35 cm³ d'acetonitrile puis par 2 fois 35 cm³ de diisopropyléther puis séché pendant une nuit sous pression réduite (1,33 kPa) à 40°C.

On obtient ainsi 5,92 g d'un produit blanc contenant 84,2 % de désacétyl-10 baccatine III.

25 Le rendement, par rapport à la désacétyl-10 baccatine III contenue dans l'extrait méthanolique initial, est de 69,5 %.

REVENDICATIONS

1 - Procédé d'obtention de la désacétyl-10 baccatine III à partir d'un extrait méthanolique des différentes parties de l'if (Taxus sp.)

2 - Procédé d'obtention de la désacétyl-10 baccatine III à partir des 5 différentes parties de l'if (Taxus sp.) caractérisé en ce que :

- 1) on traite les parties broyées de l'if par un alcool aliphatique de façon à obtenir un extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III
- 2) on dilue à l'eau l'extrait alcoolique éventuellement concentré,
- 3) on sépare par filtration, décantation, centrifugation les insolubles présents dans la 10 solution hydro-alcoolique obtenue,
- 4) on élimine la quasi totalité de l'alcool de la solution hydro-alcoolique obtenue
- 5) on extrait la désacétyl-10 baccatine III contenue dans la phase aqueuse ainsi obtenue par un solvant organique convenable,
- 6) on élimine le solvant de l'extrait organique ainsi obtenu,
- 15 7) on cristallise sélectivement la désacétyl-10 baccatine III à partir du résidu ainsi obtenu, puis
- 8) on isole la désacétyl-10 baccatine III purifiée.

3 - Procédé d'obtention de la désacétyl-10 baccatine III selon la revendication 1 caractérisé en ce que :

- 20 1) on traite les parties broyées de l'if par un alcool aliphatique de façon à obtenir un extrait alcoolique contenant la désacétyl-10 baccatine III,
- 2) on extrait l'extrait alcoolique par un solvant organique,
- 3) on sépare la phase hydro-alcoolique obtenue par décantation,
- 4) dilue à l'eau la phase hydro-alcoolique,
- 25 5) on sépare par filtration décantation ou centrifugation les insolubles présents dans la solution hydro-alcoolique obtenue,
- 6) on extrait la désacétyl-10 baccatine III de la phase hydro-organique filtrée par un solvant organique,
- 7) on élimine totalement ou partiellement le solvant de l'extrait organique contenant 30 la désacétyl-10 baccatine III,
- 8) on fait cristalliser sélectivement la désacétyl-10 baccatine III à partir de la solution ou du résidu obtenu dans un solvant organique, et
- 9) on isole la désacétyl-10 baccatine III.

4 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on obtient l'extrait alcoolique en agitant les parties broyées et éventuellement séchées de l'if dans un alcool aliphatique choisi parmi le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol et le t.butanol.

5 5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'alcool aliphatique est le méthanol.

10 6 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que les parties broyées et éventuellement séchées de l'if sont obtenues par des opérations de broyage et éventuellement de séchage qui, éventuellement précédent ou suivent des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante ou s'intercalent dans des opérations de congélation et de décongélation des parties fraîches de la plante.

15 7 - Procédé selon l'une des revendications 2, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que l'on dilue à l'eau l'extrait méthanolique éventuellement concentré de façon que le rapport entre le poids du mélange diluant et le poids de la matière sèche contenu dans l'extrait alcoolique soit compris entre 4 et 8 et que le mélange diluant eau-alcool contienne 10 à 30 % d'alcool pour obtenir une solution hydro-alcoolique.

20 8 - Procédé selon l'une des revendications 2, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que les insolubles sont séparés de la solution hydro-alcoolique par filtration, décantation ou centrifugation.

9 - Procédé selon l'une des revendications 2, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que l'on élimine l'alcool de la solution hydro-alcoolique par distillation éventuellement sous pression réduite.

25 10 - Procédé selon l'une des revendications 2, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que l'on extrait la désacétyl-10 baccatine III de la phase aqueuse, obtenue après élimination de l'alcool, par un solvant organique.

11 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le solvant organique est choisi parmi les éthers et les esters aliphatiques.

30 12 - Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que les éthers sont choisis parmi le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, le méthyl n.butyléther, le

méthyl n.amyléther, l'éthyl t.amyléther, le t.butyl isopropyléther, l'éthyl isobutyléther, le t.butyl n.propyléther et l'éthyl n.hexyléther.

13 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que les esters aliphatiques sont choisis parmi l'acétate d'éthyle, l'acétate de propyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle, l'acétate de t.butyle, le t.butylacétate de méthyle, le propionate de t.butyle et l'acétate de t.amyle.

14 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le solvant organique est l'acétate d'éthyle ou l'acétate de n.butyle.

15 - Procédé selon l'une des revendications 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que 10 l'on extrait la phase alcoolique par un solvant organique choisi parmi les hydrocarbures aromatiques.

16 - Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'hydrocarbure aromatique est choisi parmi le toluène et le xylène.

17 - Procédé selon l'une des revendications 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que 15 l'on dilue la phase hydro-alcoolique séparée par décantation par addition d'eau de façon que la teneur en alcool dans la solution soit comprise entre 20 et 40 % en poids.

18 - Procédé selon l'une des revendications 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que les insolubles sont séparés de la solution hydro-alcoolique diluée par filtration, décantation ou centrifugation.

20 19 - Procédé selon l'une des revendications 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que l'on extrait la désacetyl-10 baccatine III de la phase hydro-alcoolique par un solvant organique.

20 - Procédé selon la revendication 19 caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi les éthers et les esters aliphatiques.

25 21 - Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce que les éthers sont choisis parmi le méthyl t.butyléther, l'éthyl t.butyléther, le méthyl n.butyléther, le méthyl n.amyléther, l'éthyl t.amyléther, le t.butyl isopropyléther, l'éthyl isobutyléther, le t.butyl n.propyléther et l'éthyl n.hexyléther.

22 - Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce que les esters aliphatiques sont choisis parmi l'acétate d'éthyle, l'acétate de propyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle, l'acétate de t.butyle, le t.butylacétate de méthyle, le propionate de t.butyle et l'acétate de t.amyle.

5 23 - Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce que le solvant organique est l'acétate d'éthyle ou l'acétate de n.butyle.

24 - Procédé selon l'une des revendications 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que l'extrait organique contenant la désacétyl-10 baccatine III est concentré totalement ou partiellement par distillation éventuellement sous pression réduite.

10 25 - Procédé selon l'une des revendications 2, 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que l'on cristallise sélectivement la désacétyl-10 baccatine III dans un solvant organique choisi parmi les nitriles aliphatiques éventuellement en mélange avec un alcool aliphatique ou un ester aliphatique ou une cétone aliphatique.

15 26 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que les nitriles aliphatiques sont choisis parmi l'acétonitrile et le propionitrile.

27 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que l'alcool aliphatique est choisi parmi le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol et le n.butanol.

20 28 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que l'ester aliphatique est choisi parmi l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de n.butyle et l'acétate de t.butyle.

29 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que la cétone est choisie parmi l'acétone, la méthyl éthylcétone, la méthyl propylcétone, la méthyl n.buylcétone et la méthyl isobutylcétone.

25 30 - Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que la cristallisation sélective est effectuée dans l'acétonitrile éventuellement associé à l'éthanol et/ou l'acétate d'éthyle ou de n.butyle et/ou l'acétone

31 - Procédé selon l'une des revendications 2, 3, 4, 5 ou 6 caractérisé en ce que la désacétyl-10 baccatine III purifiée est isolée par filtration, décantation ou centrifugation.

32 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 31 caractérisé en ce que l'on
5 extrait la désacétyl-10 baccatine III à partir des feuilles de l'if.

33 - Procédé selon la revendication 32 caractérisé en ce que l'if appartient à la variété *Taxus baccata*, *Taxus breviflora*, *Taxus canadensis*, *Taxus cupidata*, *Taxus floridana*, *Taxus media* ou *Taxus wallichiana*.

34 - Utilisation de la désacétyl-10 baccatine III obtenue selon le procédé de
10 l'une des revendications 1 à 31 pour la préparation du taxol, du Taxotère ou de leurs dérivés.

35 - La désacétyl-10 baccatine III lorsqu'elle est obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 31.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C07D305/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 49, no. 4, July 1986 Columbus, Ohio, US, pages 665 - 669 C.H.O. HUANG, ET AL.: 'New taxanes from Taxus brevifolia, 2' cited in the application see page 667 - page 668 --- -/-</p>	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'B' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

12 January 1994

Date of mailing of the international search report

20.01.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

ENGLISH, R

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE II: MECANIQUE, PHYSIQUE, CHIMIE, SCIENCES DE L'UNIVERS, SCIENCES DE LA TERRE, vol. 299, no. 15 , 21 November 1984 Montreuil, FR, pages 1039 - 1043 V. SÉNILH, ET AL.: 'Hémisynthèse de nouveaux analogues du taxol. Étude de leur interaction avec la tubulin' see page 1039, paragraph 6 ----</p>	1
P,X	<p>EP,A,0 553 780 (INDENA) 4 August 1993 see example 2 -----</p>	1-3

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0553780	04-08-93	NONE	

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C07D305/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
A	<p>JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, vol. 49, no. 4 , Juillet 1986 Columbus, Ohio, US, pages 665 - 669</p> <p>C.H.O. HUANG, ET AL.: 'New taxanes from Taxus brevifolia, 2' cité dans la demande voir page 667 - page 668</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Janvier 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20.01.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ENGLISH, R

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE II: MECANIQUE, PHYSIQUE, CHIMIE, SCIENCES DE L'UNIVERS, SCIENCES DE LA TERRE, vol. 299, no. 15 , 21 Novembre 1984 Montreuil, FR, pages 1039 - 1043 V. SÉNILH, ET AL.: 'Hémisynthèse de nouveaux analogues du taxol. Étude de leur interaction avec la tubulin' voir page 1039, alinéa 6 -----</p>	1
P,X	<p>EP,A,0 553'780 (INDENA) 4 Août 1993 voir exemple 2 -----</p>	1-3

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0553780	04-08-93	AUCUN	